

BEST AVAILABLE COPY

PCT/JP 2004/016100

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

02.11.2004

REC'D 23 DEC 2004

WIPO記載されてPCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年 1 0 月 3 0 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 3 7 1 0 0 4  
Application Number:  
[ST. 10/C] :                      [ J P 2 0 0 3 - 3 7 1 0 0 4 ]

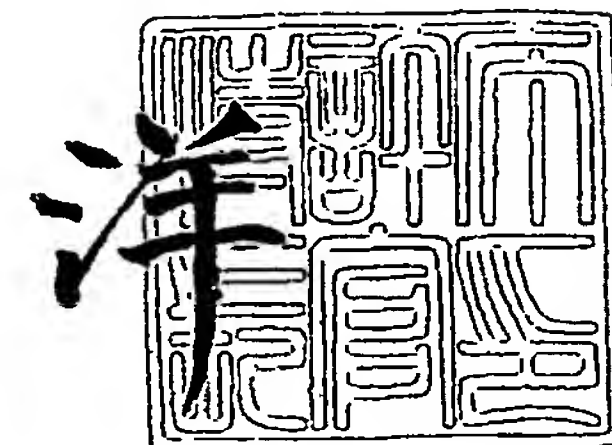
出 願 人                      第一製薬株式会社  
Applicant(s):

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月    9 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号    出証特 2 0 0 4 - 3 1 1 2 4 3 !

【書類名】 特許願  
【整理番号】 NP03-1172  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/11  
C12N 15/63

【発明者】  
【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋 5 1 9  
第一製薬株式会社 栃木研究センター内  
【氏名】 横田 博

【発明者】  
【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋 5 1 9  
第一製薬株式会社 栃木研究センター内  
【氏名】 菊屋 恵理子

【特許出願人】  
【識別番号】 000002831  
【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100088904  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 庄司 隆  
【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 067070  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA。

**【請求項 2】**

配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA の 5' 末端が、配列番号 2 に記載の塩基配列からなる DNA の 1 個または 2 個以上が該 DNA のそれぞれの 3' 末端とその 3' 末端側に位置する DNA の 5' 末端とが隣接するように連結されてなる DNA の 3' 末端に付加されてなる DNA。

**【請求項 3】**

配列番号 3 から 6 のいずれか 1 に記載の塩基配列からなる DNA。

**【請求項 4】**

請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の DNA であって、転写活性を有し、該転写活性が該 DNA に含まれる配列番号 2 に記載の塩基配列を基本配列として該基本配列の数に依存的に促進することを特徴とする DNA。

**【請求項 5】**

請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の DNA であって、転写活性を有し、該転写活性が該 DNA に含まれる配列番号 2 に記載の塩基配列を基本配列として該基本配列の数が 1 から 7 の数に依存的に促進することを特徴とする DNA。

**【請求項 6】**

請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の DNA からなる遺伝子発現調節用装置。

**【請求項 7】**

請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の DNA と構造遺伝子とを含み、該 DNA は該構造遺伝子を発現可能に配置されてなる DNA。

**【請求項 8】**

請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の DNA を含むベクター。

**【請求項 9】**

請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の DNA とエンハンサー機能を有する DNA を含むベクター。

**【請求項 10】**

構造遺伝子をさらに含む、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の DNA が該構造遺伝子を発現可能に配置されてなる請求項 8 または 9 に記載のベクター。

**【請求項 11】**

ベクターが哺乳動物発現ベクターである請求項 8 から 10 のいずれか 1 項に記載のベクター。

**【請求項 12】**

ベクターがウイルスベクターである請求項 8 から 10 のいずれか 1 項に記載のベクター。

**【請求項 13】**

遺伝子治療に用いる請求項 8 から 12 のいずれか 1 項に記載のベクター。

**【請求項 14】**

請求項 8 から 13 のいずれか 1 項に記載のベクターを導入されてなる形質転換体。

**【請求項 15】**

ベクターが哺乳動物細胞に導入されてなる請求項 14 に記載の形質転換体。

**【請求項 16】**

請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の DNA の調製方法であって、配列番号 2 に記載の塩基配列からなる DNA と配列番号 7 に記載の塩基配列からなる DNA とを反応させて二本鎖 DNA を形成させ、次いで、作製した二本鎖 DNA を結合させて結合体を作製し、その後、該結合体を鋳型として用いてポリメラーゼ連鎖反応を行うことを特徴とする DNA の調製方法。

**【請求項 17】**

ポリメラーゼ連鎖反応を配列番号 8 および 9 に記載の各塩基配列からなる DNA を用いて

行うことを特徴とする請求項 1 6 に記載の DNA の調製方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の DNA、請求項 7 に記載の DNA または請求項 8 から 1 3 のいずれか 1 項に記載のベクターを用いることを特徴とする遺伝子発現量の調節方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の DNA、請求項 7 に記載の DNA、請求項 8 から 1 3 のいずれか 1 項に記載のベクターまたは請求項 1 4 若しくは 1 5 に記載の形質転換体を用いることを特徴とする蛋白質の製造方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の DNA、請求項 7 に記載の DNA、請求項 8 から 1 3 のいずれか 1 項に記載のベクターおよび請求項 1 4 または 1 5 に記載の形質転換体のうち少なくとも 1 つを含んでなる試薬キット。

【書類名】明細書

【発明の名称】ヒト由来の量依存的プロモーター

【技術分野】

【0001】

本発明は、転写活性を有するヒト由来DNAおよびその利用に関する。より詳しくは、特定の配列の1個または複数個が結合した結合体からなり該配列の結合数に依存的に転写活性を促進し得るヒト由来DNAおよび該DNAを含むDNA構築物等に関する。また、上記DNAまたは上記DNA構築物を含むベクターおよび該ベクターを導入されてなる形質転換体に関する。さらに上記DNAの調製方法に関する。また、上記DNA、上記DNA構築物または上記ベクターを用いることを特徴とする遺伝子発現量の調節方法に関する。さらに、上記DNA、上記DNA構築物、上記ベクターまたは上記形質転換体を用いる蛋白質の製造方法に関する。また、上記DNA、上記DNA構築物、上記ベクターおよび上記形質転換体のうちの少なくとも1つを含んでなる試薬キットに関する。

【背景技術】

【0002】

DNAのもつ遺伝子情報は、通常RNAポリメラーゼによりメッセンジャーRNA (mRNA) に転写され、次いでmRNAの情報にしたがって蛋白質のアミノ酸配列に翻訳される。原核生物ではRNAポリメラーゼ単独で基本的な転写を行うことができるが、真核生物では、RNAポリメラーゼに加えて転写因子と呼ばれる一群の蛋白質が必要である。

【0003】

転写因子は、プロモーターと呼ばれる遺伝子上の領域に順に集合してRNAポリメラーゼと共に転写開始複合体を形成し、転写反応を開始させる。転写反応は、プロモーターやエンハンサーあるいはサプレッサー等の転写調節要素により調節されている。

【0004】

遺伝子発現調節用装置であるイニシエーターやプロモーターは、遺伝子の転写開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節する機能を有する。殆どの構造遺伝子のプロモーターには、基本エレメントであるTATAボックス、CCAATボックスおよびGCに富む領域が存在する。また、TATAボックスの代わりに転写開始点にイニシエーター配列をもつものもある〔イニシエーター配列；YYAN (A/T) YY、ここでYはCまたはTを意味し、NはAまたはTまたはCまたはGを意味する〕。

【0005】

プロモーターは、遺伝子工学的手法により有用蛋白質をコードする遺伝子を発現させる場合、発現効率を促進するために重要な要素である。特に、動物由来のかかる遺伝子の発現を宿主細胞として動物細胞を用いる場合、プロモーターの選択が発現効率に大きな影響を与える。従来、頻繁に用いられてきた動物細胞用プロモーターとしては、SV40プロモーター、LTRプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーターおよびアクチンプロモーター等が知られている。

【0006】

以下に本明細書において引用した文献を列記する。

【非特許文献1】サンプブック (Sambrook) ら編、「モレキュラークロニング、ア ラボラトリーマニュアル 第2版」、1989年、コールドスプリングハーバーラボラトリー。

【非特許文献2】「エンボ ジャーナル (EMBO Journal)」、1982年、第1巻、p. 841-

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、遺伝子発現調節用装置であるイニシエーターやプロモーターとしての機能を有する新規DNAを見出し、これを遺伝子発現に利用することにある。

【課題を解決するための手段】



## 【0008】

上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、シナプトタグミンXIと称されている遺伝子の転写開始点と考えられる部位の近傍に存在し、更にイニシエーターやプロモーター領域の特徴であるTATAボックス、イニシエータ配列および転写因子SP-1の結合部位を有する33merのDNAが反復している領域をインシリコの解析等により見出した。そして、該33merのDNAまたはその複数個が順次結合されてなるDNAの3'末端にTCCからなるDNAが付加されてなるDNAが転写活性を有すること、さらにその転写活性は該33merのDNAの結合数に依存的に促進することを明らかにして本発明を完成した。

## 【0009】

すなわち、本発明は、

1. 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNA、
2. 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAの5'末端が、配列番号2に記載の塩基配列からなるDNAの1個または2個以上が該DNAのそれぞれの3'末端とその3'末端側に位置するDNAの5'末端とが隣接するように連結されてなるDNAの3'末端に付加されてなるDNA、
3. 配列番号3から6のいずれか1に記載の塩基配列からなるDNA、
4. 前記1. から3. のいずれかのDNAであって、転写活性を有し、該転写活性が該DNAに含まれる配列番号2に記載の塩基配列を基本配列として該基本配列の数に依存的に促進することを特徴とするDNA、
5. 前記1. から3. のいずれかのDNAであって、転写活性を有し、該転写活性が該DNAに含まれる配列番号2に記載の塩基配列を基本配列として該基本配列の数が1から7の数に依存的に促進することを特徴とするDNA、
6. 前記1. から5. のいずれかのDNAからなる遺伝子発現調節用装置、
7. 前記1. から5. のいずれかのDNAと構造遺伝子とを含み、該DNAは該構造遺伝子を発現可能に配置されてなるDNA、
8. 前記1. から5. のいずれかのDNAを含むベクター、
9. 前記1. から5. のいずれかのDNAとエンハンサー機能を有するDNAを含むベクター、
10. 構造遺伝子をさらに含む、前記1. から5. のいずれかのDNAが該構造遺伝子を発現可能に配置されてなる前記8. または9. のベクター、
11. ベクターが哺乳動物発現ベクターである前記8. から10. のいずれかのベクター、
12. ベクターがウイルスベクターである前記8. から10. のいずれかのベクター、
13. 遺伝子治療に用いる前記8. から12. のいずれかのベクター、
14. 前記8. から13. のいずれかのベクターを導入されてなる形質転換体、
15. ベクターが哺乳動物細胞に導入されてなる前記14. の形質転換体、
16. 前記1. から5. のいずれかのDNAの調製方法であって、配列番号2に記載の塩基配列からなるDNAと配列番号7に記載の塩基配列からなるDNAとを反応させて二本鎖DNAを形成させ、次いで、作製した二本鎖DNAを結合させて結合体を作製し、その後、該結合体を鋳型として用いてポリメラーゼ連鎖反応を行うことを特徴とするDNAの調製方法、
17. ポリメラーゼ連鎖反応を配列番号8および9に記載の各塩基配列からなるDNAを用いて行うことを特徴とする前記16. のDNAの調製方法、
18. 前記1. から5. のいずれかのDNA、前記7. のDNAまたは前記8. から13. のいずれかのベクターを用いることを特徴とする遺伝子発現量の調節方法、
19. 前記1. から5. のいずれかのDNA、前記7. のDNA、前記8. から13. または前記14. 若しくは15. の形質転換体を用いることを特徴とする蛋白質の製造方法、
20. 前記1. から5. のいずれかのDNA、前記7. のDNA、前記8. から13. お

よび前記 14. または 15. の形質転換体のうち少なくとも 1 つを含んでなる試薬キット、に関する。

【発明の効果】

【0010】

本発明において見出した 33mer の DNA またはその複数個が順次結合されてなる DNA の 3' 末端に TCC からなる DNA が付加されてなる DNA において、33mer の DNA の結合数を増減することで、蛋白質の発現量を人為的に調節することが可能になる。ひいては本発明により、生活習慣病等の多因子によって引き起こされる疾患の解明に有効な手段を提供し得る。すなわち、複数の病態関連の候補蛋白質の微妙な量的変動を 33mer の DNA という基本構造をもつ同一のベクターで調節することができるため、該蛋白質の異常に起因する病態の解明に 1 つの有効な手段を提供できる。また本発明は、有用蛋白質の製造あるいは遺伝子治療用の発現ベクター等にも利用可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明は、シナプトタグミン XI と称されている遺伝子の転写開始点と考えられる部位の近傍にあって、イニシエーターやプロモーター領域の特徴である TATA ボックス、イニシエーター配列および転写因子 SP-1 の結合部位を有する 33mer の DNA が反復している領域を見出し、該 DNA の機能を明らかにしたことに基づいて達成した。

【0012】

本明細書において、上記 33mer の DNA (配列番号 2) を基本配列と称することがある。また、基本配列からなる DNA の複数個がそれぞれの末端において順次接するように連結されてなる DNA を結合体、そして結合体を構成する基本配列の数を結合数と称することがある。

【0013】

本発明の一態様は、基本配列 (配列番号 2) の 1 個または複数個を含む DNA に関する。基本配列 (配列番号 2) の 1 個を含む DNA として好ましくは、配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA が挙げられる。

【0014】

基本配列 (配列番号 2) を複数個含む DNA として好ましくは、配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA の 5' 末端が、基本配列 (配列番号 2) の 1 個または 2 個以上からなる DNA の 3' 末端に付加されてなる DNA が挙げられる。配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA に付加される基本配列 (配列番号 2) の数は、好ましくは 1 個乃至 7 個である。2 個以上の基本配列 (配列番号 2) が付加される場合は、好ましくは順次連結される基本配列 (配列番号 2) のそれぞれの 3' 末端が該 DNA の下流に隣接する DNA の 5' 末端に連結されていることが好ましい。基本配列 (配列番号 2) を複数個含む DNA として、具体的には配列番号 3 から 6 に記載の各塩基配列からなる DNA を挙げることができる。

【0015】

配列番号 1 に記載の塩基配列は、上記 33mer の DNA の 3' 末端に TCC からなる DNA が付加されてなるものであり、すなわち本明細書でいう基本配列を 1 個有する。配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA に 1 個の基本配列 (配列番号 2) が上記のように付加されてなる DNA は、基本配列 (配列番号 2) を 2 個有することになり、この DNA において結合数は 2 である。このように、本明細書においては、配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA に  $n$  個の基本配列 (配列番号 2) が上記のように付加されてなる DNA は、基本配列 (配列番号 2) を「 $n+1$ 」個有することになり、この DNA において結合数は「 $n+1$ 」である。

【0016】

本発明に係る DNA は、転写活性を有し、さらに該転写活性は基本配列 (配列番号 2) の結合数に依存的に増加することを特徴とする。例えば、配列番号 1、3、4、5 および 6 に記載の各塩基配列からなる DNA (それぞれ結合数は 1、2、3、4 および 8 で



ある) と、その下流にルシフェラーゼ遺伝子と、さらにその下流にSV40エンハンサーを含む発現ベクターでトランスフェクションしたCOS1細胞の細胞ライセートにおいて、ルシフェラーゼ活性が当該DNAに含まれる基本配列の結合数に比例して定量的に増加した(実施例1および図1を参照)ことから、基本配列の結合数が転写活性能力に影響することが明らかになった。また、結合数が3であるDNAの転写活性は、SV40プロモーターの転写活性と比較して同じかまたはそれ以上であった(実施例1および図1を参照)。一方、SV40エンハンサーを含まない発現ベクターを用いて同様に検討した結果、当該DNAの転写活性は該エンハンサーを含むベクターを用いた結果と比較して低かったが、転写活性は基本配列の結合数に比例して促進した(実施例2および図2を参照)。これらから、本発明に係るDNAが、SV40プロモーターと同じかそれ以上の転写活性を有すること、該転写活性が基本配列(配列番号2)の結合数に依存的に促進すること、該DNAはSV40エンハンサーの影響によりその転写活性がさらに著しく増加することが判明した。

#### 【0017】

本発明に係るDNAの転写活性が、基本配列(配列番号2)の結合数に依存的に促進するメカニズムは明らかではないが、結合により結合部位にポリメラーゼ等の転写開始関連因子が結合するイニシエータ配列やTATAボックスと考えられるCCATTTCからなる配列が出現し、結合数にしたがってかかるイニシエータ配列やTATAボックスの数が増加することにより転写反応が次々に開始されるために、下流の遺伝子の転写が促進されると考える(図3)。

#### 【0018】

本発明に係るDNAは、転写活性、いわゆるイニシエーター/プロモーター活性を有することから、該DNAはイニシエーターやプロモーターなどの遺伝子発現調節用装置として使用可能である。従来知られているイニシエーターやプロモーターには、本発明に係るDNAのように特定の配列の結合構造を有し、且つイニシエーター/プロモーター活性が結合数に依存的に増加するようなものは殆ど報告されていない。本明細書においてイニシエーター/プロモーター活性とは、イニシエーターやプロモーターの下流に構造遺伝子を連結して宿主に導入したときに、宿主内でまたは宿主外に該遺伝子の遺伝子産物を生産させる能力および機能をいう。かかる活性を有することから、本発明に係るDNAは遺伝子発現調節に使用することができる。イニシエーター/プロモーター活性の評価は一般的に、イニシエーターやプロモーターの下流に、レポーター遺伝子を発現可能な状態で連結させて宿主に導入し、該遺伝子の発現量を測定することで実施することができる。レポーター遺伝子としては、定量が容易に行える蛋白質をコードする遺伝子、例えばルシフェラーゼ遺伝子等の酵素蛋白質をコードする遺伝子等が用いられる。かかる評価において、レポーター遺伝子の発現の強弱により、イニシエーター/プロモーター活性の強弱を決定することができる。

#### 【0019】

本発明に係るDNAの調製は、自体公知の核酸合成法を用いて化学合成により実施できる。

また、配列番号1または2に記載の塩基配列からなるDNAは自体公知の遺伝子工学的手法を用いて、例えばゲノムDNAライブラリーを作製して鋳型とし、当該DNAを増幅することのできるプライマーを配列番号1または2に記載の塩基配列に基づいて作製して用い、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を利用して調製することができる。

#### 【0020】

本発明に係るDNAはまた、配列番号2に記載の塩基配列からなるDNAと、配列番号7に記載の塩基配列からなるDNAとを適当な条件下で反応させて二本鎖DNA(以下、アダプターと称することもある)を形成させ、次いで、作製したアダプターの複数個を公知のライゲーション法により結合させてアダプター結合体を作製し、その後、該アダプター結合体を鋳型として用い配列番号1に記載の塩基配列に基づいて作製したプライマーを使用してPCRを行い、得られたPCR増幅産物を適当なベクターに挿入し、例えば大腸



菌等の宿主を用いてクローニングした後に所望の結合体数を有するクローンを選択して、該クローンから調製することができる。アダプターを形成させる条件としては、例えば90℃にて1分間；70℃から40℃まで1時間かけて冷却；40℃で15分間インキュベーション；さらに4℃まで1時間かけて冷却するといった条件が挙げられる。またアダプターの結合は簡便には、市販のDNAライゲーションキット等を用いて実施可能である。PCRに用いるプライマーは、配列番号1に記載の塩基配列に基づいて、所望のDNAを増幅することのできるものを設計し、自体公知の方法で化学合成して得ることができる。

#### 【0021】

本発明に係るDNAのベクターへの導入を容易にするために、例えばこれらDNAの5'および3'末端に制限酵素サイトを付加するようときには、上記プライマーに所望の制限酵素サイトが付加されるように設計し、化学合成したプライマーを用いてPCRを行うことができる。具体的には例えば、制限酵素サイトとして5'末端にMluIサイトおよび3'末端にBglIIサイトが付加されたDNAの調製は、プライマーとして配列番号8に記載の塩基配列からなるDNAおよび配列番号9に記載の塩基配列からなるDNAを用いてPCRを行うことにより実施可能である。このようにして調製した制限酵素サイトを有する本発明に係るDNAは、適当な制限酵素により処理した後に、同じ制限酵素により処理したベクターのマルチクローニングサイトに導入することが可能である。上記のDNA調製方法はその例示であり、本発明にかかるDNA調製方法はこれらの例に制限されず、慣用の遺伝子工学的手法あるいは化学合成法等公知の手法を用いることができる。

#### 【0022】

本発明の一態様はまた、本発明に係るDNAと構造遺伝子とを含み、該DNAが該構造遺伝子を発現可能にその上流に配置されてなるDNA構築物に関する。かかるDNA構築物は、本発明に係るDNAと所望の構造遺伝子とを用いて公知の遺伝子工学的手法により作製することができる。構造遺伝子は、例えばヒト由来の構造遺伝子を用いるときにはヒト由来cDNAライブラリーを作製し、所望の遺伝子を増幅することのできるプライマーを該遺伝子の塩基配列に基づいて設計して合成し、PCR等の遺伝子工学的手法により得ることができる。

#### 【0023】

さらに本発明の一態様は、本発明に係るDNAを含むベクターに関する。本発明に係るベクターは、適当なベクターに本発明に係るDNAを挿入することにより得ることができる。ベクターは宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、目的により公知のベクターから所望のものを選択して使用することができる。本発明に係るDNAはヒト由来のDNAであることから、該DNAの転写活性能を利用して構造遺伝子の発現調節を行うためには哺乳動物発現ベクターを用いることが好ましい。遺伝子治療等に用いる場合にはレトロウイルスまたはワクシニアウイルス等の動物ウイルスベクター等が使用可能である。発明に係るDNAをベクターに挿入する方法としては、まず、挿入するDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターの制限酵素サイトまたはマルチクローニングサイトに挿入してベクターに組込む方法等が利用できるが、この方法に限定されず、公知の遺伝子工学的方法をいずれも利用可能である。

#### 【0024】

本発明に係るベクターは、本発明に係るDNAと構造遺伝子とを含むものであることができる。このとき当該DNAは構造遺伝子の上流に該遺伝子を発現可能に配置されることが好ましい。本発明に係るDNAを構造遺伝子の上流に連結するには、DNAリガーゼやホモポリマー法を利用することができる。DNAリガーゼにより連結する場合、例えば本発明に係るDNAと構造遺伝子とが同一の制限酵素部位を有するときはこの制限酵素で消化した後、例えば文献（非特許文献1）に記載の方法に準じて、DNAリガーゼを加えることにより、当該DNAと構造遺伝子とを連結することができる。また両者が同一の制限酵素部位を有しないときは末端をT4 DNAポリメラーゼで平滑末端化した後、同様にDNAリガーゼで処理することによりDNAと構造遺伝子との連結を行うことができる。

#### 【0025】

構造遺伝子としては、本発明のDNAあるいはベクターを用いて発現させることができるものであればいずれも用いることができ、例えば哺乳動物由来のもの、細菌類、酵母類、放線菌類、糸状菌類、子囊菌類、担子菌類等の微生物由来のもの、あるいは植物、昆虫等の生物由来のものなどが含まれるが、好ましくは哺乳動物由来のものである。

#### 【0026】

本発明に係るDNAの転写活性はエンハンサーの影響によりその能力がさらに促進されたため、上記ベクターにエンハンサーとしての機能を有するDNAを連結することにより構造遺伝子の発現をさらに促進することができる。エンハンサーとはイニシエーターやプロモーターからの転写を著しく促進する配列をいう。エンハンサーとしての機能を有するDNAは、本発明に係るDNAあるいは構造遺伝子の5'上流側または3'下流側のいずれの位置に配置してもよい。かかるDNAとしては、好ましくはSV40エンハンサーが挙げられる。ベクターにはその他、所望によりポリA付加シグナル、選択マーカーまたはターミネーター等の機能を有するDNAを連結することができる。さらに、必要により複製起点を有していても良い。選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

#### 【0027】

本発明の一態様はまた、本発明に係るDNAまたはDNA構築物が導入されてなる形質転換体に関する。本発明に係るDNAまたはDNA構築物の導入は、本発明に係るベクターあるいは本発明に係るDNA構築物を用いて実施できる。ベクターを用いて実施する方法は、周知の遺伝子工学的手法がいずれも使用可能であり、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等の方法が例示できる。ベクターを使用せずに実施する方法は、例えば公知文献（非特許文献2）に記載された方法などを用いることができる。

#### 【0028】

宿主細胞としては、好ましくは哺乳動物由来細胞、さらに好ましくは哺乳動物由来の培養細胞を用いることができる。例えば、ヒトの培養細胞としてはFL細胞やHeLa細胞等、非ヒト哺乳動物細胞としてはサル由来のCOS細胞やVerob細胞等、ハムスター由来のCHO細胞やBHK細胞等、ラット由来のGH3細胞等、マウス由来のL細胞等が挙げられるがこれらに限らず、構造遺伝子の発現や蛋白質の製造に使用されている周知の宿主細胞を使用できる。

#### 【0029】

さらに本発明の一態様は、本発明に係るDNA、DNA構築物またはベクターを用いることを特徴とする遺伝子発現量の調節方法に関する。本発明のDNAは転写活性を有し、該転写活性はその特徴として該DNAに含まれる基本配列（配列番号2）の結合数に依存的して促進する。かかるDNAを用いることにより、所望の遺伝子の発現量調節が可能になる。すなわち、本発明にかかるDNAの結合数を増減することにより、遺伝子発現量を人為的に調節することが可能である。例えば、基本配列（配列番号2）の結合数の多いものはより高い転写活性を有するため、このようなDNAを用いて構造遺伝子の発現を実施すると該遺伝子の発現量が増加し、蛋白質の生産量が増加する。一方、基本配列（配列番号2）の結合数の少ないものはより転写活性が低いため、遺伝子の発現は低くなると考えられる。遺伝子の発現量調節は、本発明に係るDNA構築物またはベクターを用いて同様に実施可能である。

#### 【0030】

本発明に係る遺伝子発現量の調節方法により、例えば生活習慣病等の多因子によって引き起こされる疾患の解明が可能になる。すなわち、複数の病態関連の候補蛋白質の微妙な量的変動を、例えば基本配列（配列番号2）をもつ同一のベクターで調節可能になるため、該蛋白質の異常に起因する病態の解明に有効な手段となり得る。

#### 【0031】

本発明に係るDNA、DNA構築物またはベクターは蛋白質の製造方法に利用することができる。例えば、本発明に係るDNAの下流に所望の構造遺伝子を配置したDNA構築



物または本発明に係るベクターを、自体公知の方法で宿主細胞に導入した形質転換体を常法に従って培養し、得られた培養物から該構造遺伝子にコードされる蛋白質を採取することにより、蛋白質の生産が可能である。培養に用いられる培地としては、ベクターを導入した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択して利用でき、培養も該宿主細胞の成育に適した条件下で実施できる。所望の蛋白質が、該形質転換体の細胞内で生産される場合は、細胞を破碎することにより目的蛋白質を抽出する。また、所望の蛋白質が細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により細胞を除去して蛋白質を得ることができる。

#### 【0032】

本発明に係るDNA、DNA構築物またはベクターにより所望の遺伝子の発現調節が可能であるため、これらは遺伝子治療に用いることができる。例えば、特定の遺伝子の発現が不足または欠如していることに起因する疾患の遺伝子治療に適用可能である。また、これらを導入した動物由来細胞、好ましくはヒト由来細胞を遺伝子治療に用いることもできる。

#### 【0033】

遺伝子治療に用いる場合、本発明に係るDNA、DNA構築物、ベクターまたは形質転換体を直接体内に導入するインビボ法と、患者の体内より標的とする細胞を一旦取り出して体外で遺伝子を導入して、その後、該細胞を体内に戻すエクスピボ法の両方の方法が可能である。インビボ法がより好ましい。遺伝子を導入する標的組織および標的細胞は、遺伝子治療（処置）の対象により適宜選択することができる。例えば、標的細胞として、リンパ球、線維芽細胞、肝細胞、造血幹細胞等の細胞を挙げることができるが、これらに制限されることはない。

#### 【0034】

遺伝子の体内または細胞内への導入法としては、非ウイルス性のトランスフェクション法、あるいはウイルスベクターを利用したトランスフェクション方法のいずれも適用することができる。非ウイルス性のトランスフェクション法は、ウイルスベクターを利用した方法と比較して、安全性および簡便性の点で優れておりかつ安価であるためより好ましい。いずれのトランスフェクション法も、遺伝子治療に用いられている各種の方法に従うことができる。

#### 【0035】

遺伝子治療に用いる場合は、一般的には、注射剤、点滴剤、あるいはリポソーム製剤として調製することが好ましい。また、プロタミン等の遺伝子導入効率を高める物質と共に投与されるような形態に調整することもできる。投与は、1日に1回または数回に分けて行うことができ、1日から数週間の間隔で間歇的に投与することもできる。

#### 【0036】

本発明に係るDNA、DNA構築物、ベクターおよび形質転換体はいずれも、それ自体を単独で、試薬等として使用できる。また、これらから選ばれる少なくとも1つを含んでなる試薬キットも、本発明に範囲に含まれる。試薬または試薬キットであるとき、これらは緩衝液、塩、安定化剤、および／または防腐剤等の物質を含んでいてもよい。

#### 【0037】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

#### 【実施例1】

#### 【0038】

(33mer結合体の作製)

シナプトタグミンXIと称されている遺伝子の転写開始点と考えられる部位の近傍にあって、イニシエーターやプロモーター領域の特徴であるTATAボックス、イニシエーター配列および転写因子SP-1の結合部位を有する33merのDNA（配列番号2）が反復している領域に着目し、33merのDNA（配列番号2）を有する結合体を作製した。以下、33merのDNA（配列番号2）を基本配列と称することがある。

## 【0039】

合成オリゴヌクレオチド、33mer Uni. (配列番号2) および33mer Rev. (配列番号7) を用い、これらを次に示す条件下で反応させ2本鎖DNAフラグメント (以下、アダプターと称する) を作製した: 90℃にて1分間; 70℃から40℃まで1時間かけて冷却; 40℃で15分間インキュベーション; さらに4℃まで1時間かけて冷却。その後、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (TAKARA社) を用いてアダプターの5'末端をリン酸化させ、DNA Ligation Kit (TAKARA社) によりアダプター結合体を作製した。

## 【0040】

33mer Uni. : 5'-TTC GGA AGA GGC GGA GTC T  
TC TTC CGA GGA CCA 3' (配列番号2)

33mer Rev. : 5'-GAA TGG TCC TCG GAA GAA G  
AC TCC GCC TCT TCC 3' (配列番号7)

## 【0041】

PGL3-Enhancer Vector (Promega社) に挿入するために、作製したアダプター結合体を鋳型とし、プライマーとしてMluI 33mer Uni. (配列番号8)、BglII R3 Long (配列番号9) を用いてPCRを実施し、アダプター結合体に制限酵素サイトを付加させた。制限酵素サイトを付加したアダプター結合体をMluI (TAKARA社) およびBglII (TAKARA社) にて37℃で1時間反応させ、PGL3-Enhancer Vectorへの挿入に供した。

## 【0042】

MluI 33mer Uni. : 5'-CGA CGC GTT TCG GAA  
GAG GCG GAG TC 3' (配列番号8)

BglII R3 Long : 5'-GGA GAT CTG AAT GGT CC  
T CGG AAG AAG AC 3' (配列番号9)

## 【0043】

(33mer結合体を含むPGL3-Enhancer Vectorの調製)

PGL3-Enhancer Vectorは、MluIおよびBglIIで37℃で1時間制限酵素処理し、次いでアルカリホスファターゼ (TAKARA社) を用いて56℃で1時間の脱リン酸化処理を3回実施した。調製した33merアダプター結合体をDNA Ligation kitを用いてPGL3-Enhancer Vector/MluI/BglII/BAPx3に挿入し、大腸菌 (DH5α; Invitrogen社) にトランスフォーメーション後、ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems社) により33mer DNAの結合体の配列と結合数の確認を行った。最終的にpGL3-Enhancer Vectorのルシフェラーゼ遺伝子上流に基本配列 (配列番号2) を1、2、3、4または8個有する結合体が配置されてなるベクターが調製できた。各ベクターに挿入された結合数1、2、3、4または8の基本配列 (配列番号2) を有するDNAを、それぞれ配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6に示した。

## 【0044】

(33mer結合体の転写活性の測定)

33mer結合体の転写活性の測定は、レポーター酵素としてホタルルシフェラーゼを有するDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega社) を用い、ルシフェラーゼ活性を指標にして行った。

## 【0045】

被検試料として、配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6の各塩基配列からなるDNAを有する上記pGL3-Enhancer Vector、ネガティブコントロールとして何も挿入していないpGL3-Enhancer Vector、ポジティブコントロールとしてSV40プロモーターおよびSV40エンハンサーを有するpGL3-Control Vector (Promega社) を用いた。同時に



、トランスフェクション効率の差異を補正するためにウミシイタケルシフェラーゼの遺伝子をレポーター酵素として有する p h R L - T K V e c t o r を内部コントロールベクターとして使用した。

#### 【0046】

ベクターをトランスフェクションする細胞としては C O S - 1 細胞を用い、10%牛胎児血清 (F B S : G I B C O 社) を含む D M E M (G I B C O 社) にて培養した。トランスフェクションは T r a n s F a s t R e a g e n t (P r o m e g a 社) を用いて定法に従い実施した。まず、C O S - 1 細胞を N U N C L O N S u r f a c e (N u n c . 社) 24 w e l l に播種 (細胞数  $5 \times 10^4$  / m l、1 m l / w e l l) した。翌日、被検試料 500 n g / w e l l、p h R L - T K V e c t o r 500 p g / w e l l を F B S を含まない新鮮培地 200  $\mu$  l / w e l l に添加し混和、そこへ T r a n s F a s t R e a g e n t 1.5  $\mu$  l / w e l l を添加、よく混和した後、室温にて10分間放置した。前日播種した細胞の培地を取り除いた後の w e l l にその混和液を加えて 37℃で1時間培養し、さらに F B S を含む新鮮培地を 1 m l 加えて 37℃にて24時間培養後、培養上清を取り除き、P a s s i v e L y s i s B u f f e r (k i t に添付) を用いて細胞ライセートを調製した。

#### 【0047】

各細胞ライセートのルシフェラーゼ活性の測定を、M i c r o L u m a t P l u s (p e r k i n E l m e r 社) を使用して行った。ルシフェラーゼ活性は、得られた測定値から、以下の式を用いて算出した値で表示した。

#### 【0048】

$$\text{比} = \frac{\text{被検試料 (ホタルルシフェラーゼ発光値) の測定値}}{\text{(Ratio) 内部コントロールベクター (ウミシイタケルシフェラーゼ発光値) の測定値}}$$

#### 【0049】

図1に示したように、基本配列 (配列番号2) の結合数に比例して、ルシフェラーゼ活性が定量的に増加した。このことから、配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6の各塩基配列からなるDNAは、該DNAの下流に配置された遺伝子を発現させ得る転写活性を有し、該転写活性は基本配列の結合数に依存的に促進することが明らかになった。また、配列番号4、配列番号5および配列番号6の各塩基配列からなるDNAによるルシフェラーゼ発現量は、SV40プロモーターと同等またはそれ以上であったことから、これらDNAはイニシエーターやプロモーターとして十分な機能を有することが判明した。

#### 【実施例2】

#### 【0050】

(シナプトタグミンX I 遺伝子上流域の調製)

ヒトゲノムDNA 10 n g を鋳型DNAとし、プライマー1 (配列番号10) およびプライマー2 (配列番号11) を用いて L A P C R k i t (T A K A R A 社) により P C R を行い、シナプトタグミンX I 遺伝子の転写調節領域のDNAを得た。本DNAを P G L - B a s i c V e c t o r に挿入するため、さらにプライマー3 (配列番号12) および B g l I I R 3 L o n g (配列番号9) を用いて P C R を実施し、制限酵素サイトを付加した。P G L - B a s i c V e c t o r は、実施例1で用いた P G L 3 - E n h a n c e r V e c t o r と比較して、SV40エンハンサー部位が欠如している他は、全く同じ構成要素を有するベクターである。

#### 【0051】

プライマー1: 5' - G G C A G T C G A T A C T G A A A T C C A G G C - 3' (配列番号10)

プライマー2: 5' - G A A T G G T C C T C G G A A G A A G A C T C C - 3' (配列番号11)

プライマー3: 5'-CGA CGC GTG GCA GTC GAT ACT G  
AA ATC CAG-3' (配列番号12)

#### 【0052】

(上記DNAを含むPGL3-Basic Vectorの調製)  
PGL3-Basic Vector (Promega社) をMluI (TAKARA社)、BglII (TAKARA社) で37℃: 1h制限酵素処理し、アルカリホスファターゼ (TAKARA社) にて56℃: 1hで3回脱リン酸化処理を実施した。調製した転写調節領域DNAをLigation kit (TAKARA社) を用いてPGL3-Basic Vector / MluI / BglII / BAPx3 に挿入し、大腸菌 (DH5α; Invitrogen社) にトランスフォーメーション後、ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems社) により塩基配列の確認を行い、レポーターアッセイに供した。得られたベクターに導入された転写調節領域の塩基配列を、配列番号13または配列番号14に示す。配列番号13および配列番号14に記載の各塩基配列からなるDNAは、それぞれ基本配列 (配列番号2) の結合数が2および3であるDNAを含むことが判明した。また、配列番号3に記載の塩基配列からなるDNA [基本配列 (配列番号2) の結合数が2である] を同様の方法でPGL3-Basic Vectorに導入し、レポーターアッセイに供した。

#### 【0053】

レポーターアッセイは、レポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼ遺伝子を用い実施例1と同じ方法により実施した。図2に示すように、上記各ベクターを導入された形質転換体において発現されたルシフェラーゼの活性は、挿入された配列番号14または配列番号15に記載の塩基配列からなるDNAに含まれる基本配列 (配列番号2) の結合数に比例して定量的に増加した。一方、配列番号3に記載の塩基配列からなるDNAを挿入したベクターを導入された形質転換体において発現されたルシフェラーゼ活性は、配列番号14または配列番号15に記載の塩基配列からなるDNAと比較して低かったが、コントロールベクターを導入したものと比較して明らかに増加した。

#### 【0054】

これらから、SV40エンハンサーの影響がない条件下においても、基本配列 (配列番号2) を有するDNA自体が転写活性を示すこと、また該転写活性は基本配列 (配列番号2) の結合数に依存的に促進することが明らかになった。

#### 【0055】

さらに、基本配列 (配列番号2) の結合数が2であるDNAを含むベクターを導入された形質転換体のルシフェラーゼ活性が、SV40エンハンサーを有さないベクター (図2) に比べて、SV40エンハンサーを有するベクター (図1) では著しく高いことから、該DNAの転写活性はSV40エンハンサーの影響によりさらに著しく増加することが判明した。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0056】

本発明は、遺伝子発現量の人為的な調節や有用蛋白質の製造等のために利用可能であり、基礎科学研究から医薬開発まで広い分野で非常に有用性が高い。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0057】

【図1】配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6の各塩基配列からなるDNA [基本配列 (配列番号2) の結合数はそれぞれ1、2、3、4および8である] と、その下流にルシフェラーゼ遺伝子と、SV40エンハンサーとを含む発現ベクターでトランスフェクションしたCOS1細胞の細胞ライセートにおいて、ルシフェラーゼ活性が当該ポリヌクレオチドの結合数に比例して定量的に増加したことを説明する図である。図中SV40プロモーターとは、上記DNAの代わり、SV40プロモーターを含む発現ベクターでトランスフェクションしたCOS1細胞の細胞ライセートを示す。(実施例1)

【図2】配列番号3、配列番号14、および配列番号15の各塩基配列からなるDNA〔基本配列（配列番号2）の結合数はそれぞれ2、2および3である〕と、その下流にルシフェラーゼ遺伝子とを含み、SV40エンハンサーは含まない発現ベクターでトランスフェクションしたCOS1細胞の細胞ライセートにおいて、ルシフェラーゼ活性が当該ポリヌクレオチドの結合数に比例して定量的に増加したことを説明する図である。図中、ベクターに挿入したDNAの1はpGL-Basic Vectorのみ、2は配列番号14に記載の塩基配列からなるDNAを挿入したベクター、3は配列番号15に記載の塩基配列からなるDNAを挿入したベクター、4は配列番号3に記載の塩基配列からなるDNAを挿入したベクターを用いた結果を示す。（実施例2）

【図3】本発明に係るDNAの転写活性が基本配列（配列番号2）の結合数に依存的に促進するメカニズムは、結合体の結合部位に出現する、RNAポリメラーゼ等の転写開始関連因子が結合するイニシエータ配列やTATAボックスの数が、結合数にしたがって増加することによると考えられることを説明する模式図である。当該ポリヌクレオチドには転写因子SP-1が結合するコンセンサスGCボックスが存在し、結合数にしたがってSP-1の結合部位も同様に増加する。

【配列表フリーテキスト】

【0058】

- 配列番号1：イニシエーター／プロモーターとして機能し得る設計されたポリヌクレオチド。
- 配列番号2：配列番号1のポリヌクレオチドの5'末端に付加したときに該ポリヌクレオチドのイニシエーター／プロモーター活性を促進し得る設計されたポリヌクレオチド。
- 配列番号3：イニシエーター／プロモーターとして機能し得る設計されたポリヌクレオチド。
- 配列番号4：イニシエーター／プロモーターとして機能し得る設計されたポリヌクレオチド。
- 配列番号5：イニシエーター／プロモーターとして機能し得る設計されたポリヌクレオチド。
- 配列番号6：イニシエーター／プロモーターとして機能し得る設計されたポリヌクレオチド。
- 配列番号7：配列番号2のポリヌクレオチドと二本鎖DNAを形成するように設計されたポリヌクレオチド。
- 配列番号8：プライマーとして機能し得る設計されたポリヌクレオチド。
- 配列番号9：プライマーとして機能し得る設計されたポリヌクレオチド。
- 配列番号10：プライマーとして機能し得る設計されたポリヌクレオチド。
- 配列番号11：プライマーとして機能し得る設計されたポリヌクレオチド。
- 配列番号12：プライマーとして機能し得る設計されたポリヌクレオチド。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Human quantitative promotor

<130> NP03-1172

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide that can work as a initiator/promotor

<400> 1

ttcgggaagag gcggagtctt cttccgagga ccattc

36

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide that can enhance the initiator/promotor activity of the polynucleotide of SEQ ID NO;1 when being ligated to the 5' end of the same

<400> 2

ttcgggaagag gcggagtctt cttccgagga cca

33

<210> 3

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide that can work as a initiator/promotor

<400> 3

ttcgggaagag gcggagtctt cttccgagga ccattcggaa gaggcggagt cttcttccga

60



ggaccattc

69

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 102

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed polynucleotide that can work as a initiator/promotor

&lt;400&gt; 4

ttcgggaagag gcggagtctt cttccgagga ccattcggaa gaggcggagt cttcttccga 60

ggaccattcg gaagaggcgg agtcttcttc cgaggacat tc 102

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 135

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed polynucleotide that can work as a initiator/promotor

&lt;400&gt; 5

ttcgggaagag gcggagtctt cttccgagga ccattcggaa gaggcggagt cttcttccga 60

ggaccattcg gaagaggcgg agtcttcttc cgaggacat tcggaagagg cggagtcttc 120

ttccgaggac cattc 135

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 267

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed polynucleotide that can work as a initiator/promotor

&lt;400&gt; 6

ttcgggaagag gcggagtctt cttccgagga ccattcggaa gaggcggagt cttcttccga 60

ggaccattcg gaagaggcgg agtcttcttc cgaggacat tcggaagagg cggagtcttc 120

ttccgaggac cattcgggaag aggccggagtc ttcttccgag gaccattcgg aagaggcggga 180

gtcttcttcc gaggaccatt cggaagaggc ggagtcttct tccgaggacc attcgggaaga 240

ggcggagtct tcttccgagg accattc

267

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide to form a double strand DNA with the polynucleotide of SEQ ID NO:2

<400> 7

gaatggtcct cggaagaaga ctccgcctct tcc

33

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide that can work as a primer

<400> 8

cgacgcgttt cggaagaggc ggagtc

26

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide that can work as a primer

<400> 9

ggagatctga atggtcctcg gaagaagac

29

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide that can work as a primer

<400> 10

ggcagtcgat actgaaatcc aggc

24

<210> 11  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide that can work as a primer

<400> 11  
gaatggtcct cggaagaaga ctcc 24

<210> 12  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide that can work as a primer

<400> 12  
cgacgcgtgg cagtcgatac tgaaatccag 30

<210> 13  
<211> 348  
<212> DNA  
<213> homo sapiens

<400> 13  
ggcagtcgat actgaaatcc aggcagtaca gaattttatt ttcccaaaat tctggaactc 60  
aggaccgaga acattttgct gctgtattaa agcccagaaa actgaaatca gaggatttca 120  
tataataatc tacctatgct tcttaccctt cagtactttc tcgtttttgga accacagcgc 180  
gtcagtgggc ggggcctcat tctcgggaaa actcggcggt gggaggagtc ccctccggga 240  
gagcttcctg aagggggcga gggctgactt ccgtaatctt tcggaagagg cggagtcttc 300  
ttccgaggac cattcggaag aggcggagtc ttcttccgag gaccattc 348

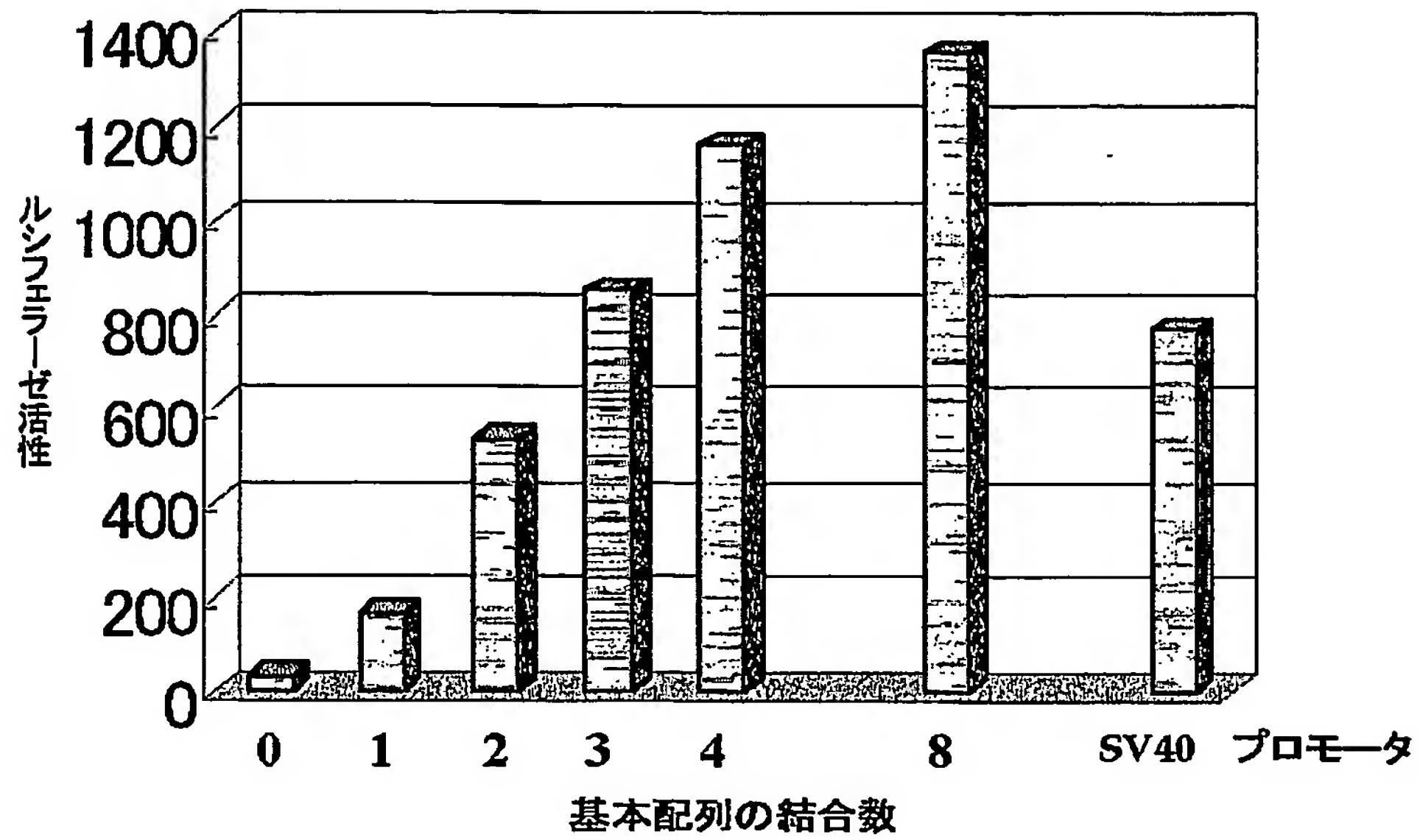
<210> 14  
<211> 381  
<212> DNA  
<213> homo sapiens

&lt;400&gt; 14

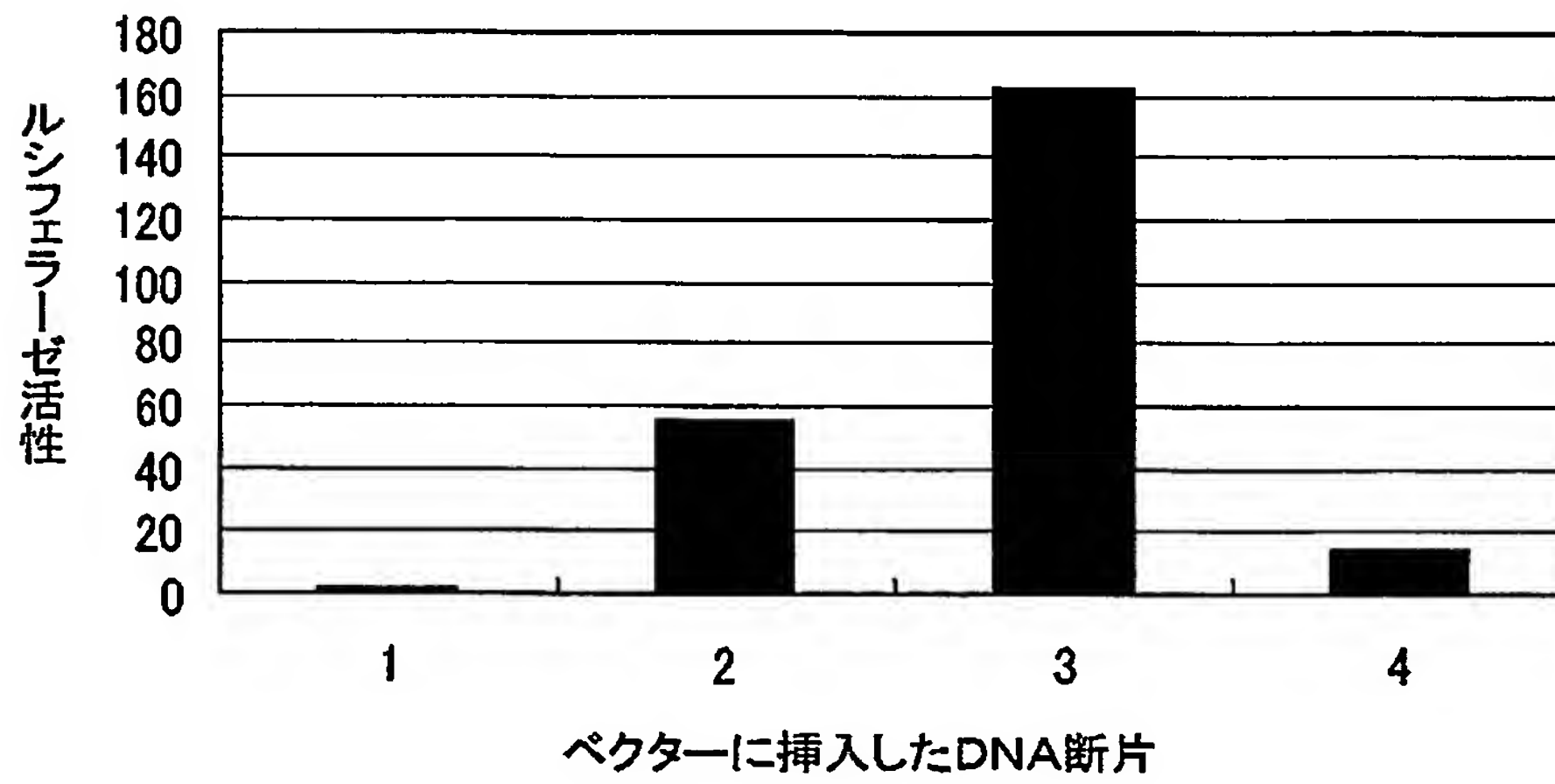
ggcagtcgat actgaaatcc aggcagtaca gaattttatt ttcccaaaat tctggaactc 60  
aggaccgaga acattttgct gctgtattaa agcccagaaa actgaaatca gaggatttca 120  
tataataatc tacctatgct tcttaccctt cagtactttc tcgtttttgga accacagcgc 180  
gtcagtgggc ggggcctcat tctcgggaaa actcggcggt gggaggagtc ccctccggga 240  
gagcttcctg aagggggcga gggctgactt ccgtaatctt tcggaagagg cggagtcttc 300  
ttccgaggac cattcggaag aggcggagtc ttcttccgag gaccattcgg aagaggcgga 360  
gtcttcttcc gaggaccatt c 381

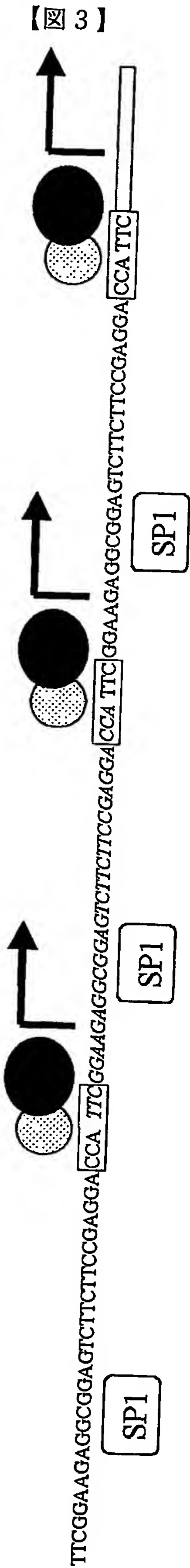


【書類名】 図面  
【図 1】



【図 2】





**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** イニシエーターやプロモーターとしての機能を有する新規 DNA を見出し、これを遺伝子発現に利用すること。

**【解決手段】** 基本配列（配列番号 2）の 1 個を有する配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA、配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA の 5' 末端が、基本配列（配列番号 2）の 1 個または 2 個以上からなる DNA の 3' 末端に付加されてなる DNA、さらに構造遺伝子を含む前記 DNA、前記 DNA を挿入してなるベクター、該ベクターを導入されてなる形質転換体、前記 DNA およびベクターおよび形質転換体のうちのいずれかを用いる遺伝子発現調節方法または蛋白質製造方法、前記 DNA およびベクターおよび形質転換体のうちのいずれか 1 つを含んでなる試薬キット。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 3 7 1 0 0 4
受付番号	5 0 3 0 1 8 0 4 0 6 1
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 1 0 月 3 1 日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年10月30日



特願 2 0 0 3 - 3 7 1 0 0 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 2 8 3 1 ]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 2 8 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区日本橋 3 丁目 1 4 番 1 0 号
氏 名	第一製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**